






Biblioteka Jagiellońska
1002950127



Zur Kenntniss der Tenacität der Choleravibrionen.

Von
Dr. Justyn Karliński
in
Stolač.

Den klassischen Untersuchungen Kitasato's, nach denen den Choleravibrionen innerhalb der Fäkalmassen nur eine sehr kurze Lebensfähigkeit zukommt, entgegen steht bis jetzt die Beobachtung Gruber's, dem der Nachweis der Choleravibrionen noch nach 15 Tagen gelungen ist, vereinzelt da.

Ohne jedwede Absicht, den Ergebnissen der Arbeit Kitasato's nahe treten zu wollen, will ich in Nachstehendem in Kürze über eigene Untersuchungen über das Verhalten der Choleravibrionen in den Dejekten eines Erkrankten berichten. Vor circa zwei Jahren habe ich meinen Freund Dr. W. Reichert, der auf einer Weltumsegelung begriffen war, gebeten, mir gelegentlich seines Aufenthalts in Indien Cholerakoth zu verschaffen, da ich gerne einige Präparate der reiswasserähnlichen Stühle besitzen wollte. Mitte Februar laufenden Jahres erhielt ich endlich aus Lahore in Indien eine Sendung Eprouvetten, in denen Choleradejektionen enthalten sein sollten. Der Zuschrift des Dr. R. gemäss sollten dies Dejekte eines Eingeborenen sein, der unter typischen Choleraerscheinungen erkrankt war, jedoch nach 8tägigem Leiden genesen ist.

Was die Sendung anbelangt, so bestand dieselbe aus 4 Eprouvetten, welche ausser dem Watteverschluss mit 3fachen Kautschukklappen bedeckt und mit Siegellack verklebt waren.

Eprouvette I beherbergte in ihrer kuppelartigen Vertiefung circa 3 ccm einer gelblichen, schleimigen Masse, welche bei Bewegung sich schleimartig zog, und deren einzelne Partieen den Wänden und der Watte anhafteten.

Eprouvette II beherbergte circa 5 ccm einer ebenso aussehenden Masse, die jedoch flüssiger war, in deren Watteverschluss reichliche Schimmelpilzwucherung zu sehen war.

Eprouvette III enthielt eine geringe Menge eingetrockneter Fäkalmassen ohne jedwede Flüssigkeit.

Eprouvette IV, welche in eine dünne und zugeschmolzene Spitze ausgezogen war, war bis zu $\frac{3}{4}$ mit einer gelblichen Flüssigkeit, welche sich bald schichtenweise setzte, gefüllt.

Ich schicke gleich voraus, dass zwischen der Absendung der Kothproben und ihrer Ankunft in Stolač genau 23 Tage verflossen waren. Aus dem Inhalt der Eprouvette I wurden gleich einige Ausstrichpräparate gemacht und mit konzentrirter Fuchsinlösung gefärbt, wobei nebst reichlichen Detritusmassen grosse Mengen verschiedenartiger Mikroben aufgefunden wurden. Es fanden sich wohl hier und da gekrümmte Stäbchen, die ich jedoch bei dem Umstande, dass in faulenden Flüssigkeiten allerhand Vibrionen beständig zu finden sind, gar nicht als Choleravibrionen ansprechen wollte. Die mikroskopische Beobachtung des Inhaltes sämmtlicher Röhrchen ergab das gleiche Resultat, ich konnte trotz aller Bemühungen und sehr zahlreichen Präparaten nie mit Bestimmtheit die recht spärlichen Vibrionen als die Koch'schen ansprechen und nie ein Bild erlangen, welches wenigstens entfernt den so allgemeinen Bildern von Cholerafäces entsprachen, auffinden. In der Absicht, die aufgefundenen gekrümmten Stäbchen rein zu züchten und dadurch ihre Natur festzustellen, unternahm ich verschiedenartige Verdünnungen des Inhalts sämmtlicher Röhrchen, von denen einige gegen alles Erwarten zu dem überraschenden Erfolge führten und zwar zu dem, dass die zugeschickten Kothproben wirkliche und lebensfähige Choleravibrionen enthielten.

Ich habe folgendes Verfahren eingeschlagen: I. In 5 Kölbchen mit je 40 ccm einer neutralen Fleischwasserpeptonbouillon wurde je eine Oese des zugeschickten Kothes aus den Eprouvetten I, III, IV eingelegt und im Brutkasten bei 30° C aufbewahrt.

II. In 2 Kölbchen wurde eine Mischung von steriler Fleischwasserpeptonbouillon mit gleicher Menge sterilisirter und durch Wachsthum der echten Choleravibrionen verflüssigter Gelatine gegeben und nach Entnahme einzelner, zu Kontrollplatten verwendeten Proben, mit der beschmutzten Watte der ersten und dritten Eprouvette inficirt.

III. 200 Gramm einer Bauchspeicheldrüse (Pankreas) des Rindes wurden nach Fettentnahme gewiegt, mit 500 ccm Wasser begossen, 24 Stunden am kühlen Orte stehen gelassen, abfiltrirt und nach Zugabe von 20 Gramm Peptonum siccum (Adamkiewicz) zu einer Bouillon, die mit phosphorsaurem Natron neutralisirt wurde, verarbeitet. Mit dieser Bouillon, die ich der Kürze halber Pankreasbouillon nennen werde, wurden 10 Eprouvetten beschickt und nach 3tägiger Sterilisirung mit Proben aus allen zugeschickten Eprouvetten inficirt und im Thermostaten bei 30° C aufbewahrt.

IV. Ausserdem wurde der Inhalt der Eprouvette No. IV nach entsprechender Verdünnung mit steriler Bouillon zu Plattenkulturen mit 10% Fleischwasserpeptongelatine verwendet.

Ich muss bemerken, dass die Inficirung im Versuche I und II am 24. Tage nach der Absendung (resp. Entnahme) der Kothproben, die im Versuche III erst am 28. Tage stattfand. Die Beobachtung der Kölbchen nach 24 Stunden ergab deren beginnende Trübung. Aus den mikroskopischen Präparaten, welche aus der getrübten Bouillon der Versuche I und II angestellt wurden, ergab sich eine Unmasse von verschiedenartigen Mikroben, ohne dass gerade irgend welche Vibrionen überhand nahmen. In den Kölbchen des Versuches II waren wohl hier und da Spirillen und Vibrionen vorhanden, die jedoch gegenüber den sonstigen Bakterien sehr in der Minorität waren; es wurde aus diesen Proben ein Theil zu Plattenkulturen verwendet. Die Trübung in den Kölbchen dieser beiden Versuchsreihen nahm von Tag zu Tag zu, es kam jedoch zu keiner ausgesprochenen Vermehrung der Vibrionen, zu keiner oberflächlichen Häutchenbildung. Auf den täglich hergestellten Platten erwuchsen 2 festwachsende und 3 verflüssigende Stäbchenarten, ein festwachsender und 4 verflüssigende Kokkenarten, ein Hefepilz und ein Schimmelpilz mit gelbem Rasen, den ich bis jetzt bei den Luftuntersuchungen meines Laboratoriums nicht beobachtet habe. Alle diese Pilze erwiesen sich als sehr sauerstoffbedürftig, da sie in den Rollkulturen, die bei Sauerstoffabschluss (Methode Buchner) angelegt wurden, sämmtlich fehlten. Hier wuchs nur eine Bacillenart in schleierartigen, grauen Kolonieen, welche die Gelatine langsam verflüssigte.

Auf den Platten (Versuch IV), die direkt aus dem Inhalt der Eprouvette IV angelegt wurden, wuchsen die oben besprochenen Pilze und ausserdem eine fest wachsende Vibrionenart, welche ich nach angestelltem Vergleich mit den Originalkulturen der Vibrionen, die ich von Dr. Weibel erhielt, als Vibrio saprophiles „α" — anzusprechen geneigt bin. Ich habe mir bei Musterung jeder Platte, die in diesen Versuchsreihen angelegt wurde, die grösste Sorgfalt auferlegt, jede den oben genannten Pilzen entsprechende Kolonie abgeimpft und einer mikroskopischen Untersuchung unterzogen, fand jedoch weder Choleravibrionen noch den von Kitasato[1]) beschriebenen und der Cholerakultur ähnlich wachsenden Bacillus. Ich glaubte also, annehmen zu dürfen, dass entweder in den zugeschickten Kothproben keine lebensfähigen Choleravibrionen mehr enthalten waren und die ursprünglich gesehenen Vibrionen nur dem Vibrio saprophiles entsprachen, oder dass hier ein Irrthum in der Diagnose vorlag.

Unterdessen war die Zubereitung der Pankreasbouillon fertig, und ich schritt zur Beobachtung des Verhaltens der im Kothe befindlichen Bakterien in derselben. Bereits nach 2 Tagen bildete sich eine sehr intensive Trübung, nach 3 Tagen waren einzelne Blättchen an der Oberfläche zu sehen, welche aufgefischt und

1) Zeitschrift für Hygiene. Bd. V. Heft 3.

mikroskopisch untersucht, vorwiegend aus kurzen, gekrümmten Stäbchen bestanden, hier und da waren kugelige oder längliche, aufgequollene, intensiv sich färbende Gebilde zu sehen. Einzelne der entnommenen Partieen wurden nach entsprechender Verdünnung zu Plattenkulturen verwendet.

Im Verlaufe der 3 folgenden Tage nahm die Blättchenbildung auf der Oberfläche merklich zu und die mikroskopische Beobachtung zeigte stets denselben Befund. In den Proben, die aus der Tiefe der getrübten Bouillon mit der Pipette herausgenommen wurden, waren vorwiegend kurze Stäbchen zu sehen.

Die Musterung der Plattenkulturen, die mit den Blättchen angestellt wurde, ergab eine Anzahl Kolonieen, welchen nur 2 Mikroorganismen angehörten. Die ersteren waren die oben besprochenen, fest wachsenden, weissen Kokken, die andern gehörten einer Vibrioart, die sich als kleine, mit unregelmässig gebuchteten Konturen umgebene, gelblich-weisse Kolonieen präsentirten, die nach 2 Tagen grösser wurden, wobei gleichzeitig der mittlere Theil sich etwas dunkler präsentirte. Nach Verlauf von 4 Tagen fingen die oberflächlichen Kolonieen an einzusinken und es bildete sich allmählich ein scharfrandiger Trichter, auf dessen Grunde die schwach gelbliche Kolonie lag und sich als eine mässig granulirte, matte Scheibe manifestirte. Diese Kolonieen bestanden aus kurzen, krummen Stäbchen, darunter einige, die mehrere Windungen zeigten, die sich mit Anilinfarbstoffen gut färbten und im frischen Zustande lebhafte Bewegungen zeigten. Bei einzelnen Kolonieen konnte ich bei Beobachtung während der Trichterbildung einen rosigen Schein bei denselben wahrnehmen. Die Anzahl der soeben besprochenen Kolonieen war auf den diesbezüglichen Platten nicht gross, weit hinter der zurückstehend, die den festwachsenden Kokken entsprach. Sie vergrösserten sich sehr langsam; eine vollständige Verflüssigung der Platten trat nicht ein und die einzelnen Kolonieen erreichten nach 10 Tagen kaum einen Durchmesser von $2^1/_2$ mm. Die oben besprochenen Kolonieen des fraglichen Vibrio wurden abgeimpft und auf 10%ige Fleischwasserpeptongelatine übertragen. Ihr Wachsthum wurde im Thermostaten bei 20° C beobachtet.

In den ersten 24 Stunden war von der Einstichstelle aus ein sich allmählich verjüngender Strich von weisser Farbe zu sehen, welcher 48 Stunden nach dem Einstiche sich konisch zu verdicken anfing. An dieser Stelle war nach 56 Stunden eine beginnende Verflüssigung des Nährbodens deutlich sichtbar. Es kam zur Bildung eines Trichters, welcher von der Oberfläche der Gelatine aus leer war, von da aus aber leicht wolkigen Niederschlag beherbergte. Gleichzeitig konnte ich eine Dickenzunahme des ursprünglichen Stiches beobachten, welcher sich in einen Kanal umwandelte und mit wolkigen, weissen Massen gefüllt war. Am 4. Tage war der mit Luft gefüllte Raum an der oberen Spitze des Einstichkanals sehr deutlich sichtbar; von nun an schritt die Verflüssigung nach und nach vor und erreichte am 6. Tage die Wände der 18 mm im Durchmesser haltenden Eprouvette. Eine Entwickelung irgend eines Geruchs wurde nicht beobachtet. Auf Kartoffelscheiben über-

tragen, wuchs der Vibrio bei 30° C als dünner, graubräunlicher, sich ziehender Rasen; auf Agar-Agar als grau-gelblicher, feucht glänzender Ueberzug.

Die Gram'sche Färbung der Vibrionen gelang nicht, in einige Tage alten Kulturen waren oft Exemplare, an denen mehrere Windungen zu sehen waren, vorhanden. In dem Nährboden, welcher aus Kiebitzeiweiss nach der Vorschrift von Hovorka und Winkler[1]) hergestellt wurde, wuchs der Pilz als grau schimmernder zarter Belag ohne Verflüssigung des Nährbodens. In einer sterilen Peptonlösung, die aus 2 % Pepton (Witte) und 0,5 % Kochsalz hergestellt wurde, verursachte der Pilz bei 36° C eine intensive Trübung und nach Zugabe von 1 ccm Salzsäure nahm die Lösung nach 12 Stunden eine rosarothe, nach 20 Stunden eine purpurrothe Färbung an.

Da nach dem oben Besprochenen der Verdacht auf das Vorkommen des Choleravibrio nicht unterdrückt werden konnte und andererseits gegenüber den Befunden Kitasato's diese Annahme mir noch zu gewagt schien, unternahm ich eine Reihe von Kontrolluntersuchungen, um mir die Gewissheit zu verschaffen, ob es sich wirklich um das Auffinden eines lebensfähigen Koch'schen Vibrio in den zugeschickten Kothproben handelte. Mein Laboratorium verfügte zu dieser Zeit über Cholerakulturen verschiedener Provenienz; ich besitze Kulturen, die aus dem Materiale während der Epidemieen in Paris, Palermo, Neapel, Marseille, Triest, Pest und Finthen herstammten. Ich habe von sämmtlichen Kulturen Uebertragungen in Bouillon vorgenommen und zu Plattenkulturen verwendet, ausserdem habe ich Platten mit dem soeben gefundenen Vibrio, dem Käse-Spirillum Deneke und dem Finkler-Prior-schen Vibrio Proteus gemacht, ich habe denselben Nährboden, dieselben Temperaturverhältnisse und denselben Verdünnungsgrad des Materiales angewendet und erhielt als Resultat, dass es sich hier um wirkliche Koch'sche Choleravibrionen handelte. Um mich kurz zu fassen, führe ich hier an, dass es mir nicht gelang, irgend welche Wachsthumsunterschiede sowohl in den Platten wie in den Stich- und Kartoffelkulturen zwischen dem aufgefundenen Vibrio und den Kontrollplattten oder Stichkulturen, die aus dem obenerwähnten Choleramateriale angestellt wurden, zu finden, und andererseits gelang es mir, durch Vergleichen mit den Kulturen des Käsespirillums und dem Finkler'schen Vibriospirillum die bis jetzt als charakteristisch angesehenen Wachsthumsunterschiede herauszubringen.

Wenn man sich aus 250 g Pankreas, 500 g Wasser, 6 % Pepton siccum (Adamkiewicz), 0,5 % Kochsalz, 10 % Gelatine einen Nährboden herstellt und denselben nach erfolgter Neutralisirung statt der üblichen, 3 Tage nach einander durchgeführten Sterilisirung durch 6 Tage nach einander der Temp. 100° C durch 8 Minuten

1) Allgem. Wiener med. Ztg. 1889, Nr. 23.

aussetzt, so erhält man in dem etwas weichen und schwach gelblichen Nährboden ein eigenartiges und, wie ich bis jetzt sehen konnte, als Unterscheidungsmerkmal von den verwandten Vibrionen verwendbares Wachsthum der Koch'schen Vibrionen.

Während die Deneke'schen und Finkler'schen Vibrionen ebenso wie in der üblichen Nährgelatine, jedoch etwas schneller wachsen, ist das Wachsthum der Choleravibrionen schon vom 2. Tage an insofern verschieden, als aus dem Stichkanal, welcher nach oben zu bereits einzusinken beginnt, wurzelartige, kurze Auswüchse auszuschlagen beginnen, welche in den folgenden Tagen keulenartig anschwellen, wodurch die Kultur nicht unähnlich einem mittelalterlichen Morgenstern wird. Bereits vom 5. Tage an beginnen die keulenartigen Auswüchse unter einander zu verfliessen, wodurch der an und für sich dünne Impfstich die Form einer Keule annimmt, und während der obere Theil des Stichkanals den Rand der Eprouvette noch nicht erreicht hat, ist der untere, welcher mit weissen dichten Flocken gefüllt ist, durch die Glaswände begrenzt. Dieses Wachsthum konnte ich ebensowohl in Zimmertemperatur (12—16° C) wie in Brustkastentemperatur von 21° wahrnehmen; ich vermisste es aber stets bei Kulturen des Vibrio Proteus oder des Käsespirillums. Die Verimpfung einer so gewachsenen Kultur auf den üblichen Gelatinenährboden hatte ein ganz charakteristisches und bis jetzt schon zur Genüge beschriebenes Wachsthum der Cholerastichkulturen zur Folge.

Wenn der soeben besprochene Nährboden nur 3mal sterilisirt wurde oder aus irgend welchem Grunde (ausgenommen etwa eine vermehrte Zugabe von Gelatine) hart blieb, konnte ich das Austreiben der Auswüchse niemals beobachten; die Verflüssigung des Nährbodens durch Wachsthum der Kultur lässt ziemlich lange auf sich warten, so dass das Aussehen der Kultur durch die ersten 3 Tage in Brutkastentemperatur dem Aussehen eines festwachsenden Pilzes gleicht.

Unter meinen Cholerakulturen befand sich zur Zeit dieser Untersuchungen eine von der Triester Epidemie herstammende und seit 14 Monaten nicht mehr umgezüchtete Agarkultur. Als ich mit gewöhnlichem Bouillonnährboden Verdünnungen anstellte und mit der üblichen Fleischwasserpeptongelatine Plattenkulturen anfertigte, bekam ich auf 21 Platten kaum 11 Kolonieen von wirklicher Cholera, ohne Beimengung fremder Organismen. Eine in keinem Verhältnisse zu der angestellten Verdünnung stehende Anzahl von Kolonieen! Die gleiche Oese aus derselben Kultur in gleiche Menge von Pankreasbouillon hineingethan und unter sonst gleichen Verhältnissen mit der gewöhnlichen Fleischwasserpeptongelatine zu Plattenkulturen verarbeitet, ergab mir eine grosse, ja fast zehnfache Anzahl von Kolonieen. Durch wiederholte und mit gleichem Resultate gekrönte Experimente belehrt, bin ich geneigt anzunehmen, dass Pankreasbouillon irgend welche der Entwickelung der Choleravibrionen zusagende Verbindungen beherbergt, und ich glaube nicht zu weit zu gehen, wenn ich denselben die Auffindung

der Choleravibrionen in lebensfähigem Zustande in den Dejekten zuschreibe, obwohl mich die bis jetzt angewendeten Methoden beim Nachweise der Vibrionen im Kothe im Stich liessen.

Stolač, im Mai 1890.

